

Aus der Universitäts-Frauenklinik Marburg

Direktor: Prof. Dr. med. R. Buchholz

Untersuchungen über den Einfluß eines
alloxaninduzierten Diabetes mellitus auf
Stoffwechsel und Ultrastruktur
von Rattenovarien

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

KURT-MARTIN NIETHAMMER

aus Berlin

Marburg 1977

Druck: Mauersberger, Marburg

Aus der Universitäts-Frauenklinik Marburg

Direktor: Prof. Dr. med. R. Buchholz

Untersuchungen über den Einfluß eines
alloxaninduzierten Diabetes mellitus auf
Stoffwechsel und Ultrastruktur
von Rattenovarien

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

KURT-MARTIN NIETHAMMER

aus Berlin

Marburg 1977

Druck: Mauersberger, Marburg



Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Universität Marburg am 15. April 1977

gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr.med. F. Neurath

Referent: Prof. Dr.med. R. Buchholz

Korreferent: Prof. Dr.med.dent. H. Bernhardt

Benutzte Abkürzungen

ADP	: Adenosin diphosphat
ATP	: Adenosin triphosphat
EDTA	: Äthylen-diamintetraessigsäure
Fg	: Frischgewicht
FSH	: Follikelstimulierendes Hormon
G-6-PDH	: Glukose-6-phosphat dehydrogenase
HCG	: Human Chorionic Gonadotropine
ICD	: Iso-citrat-Dehydrogenase
LH	: Luteinlisierendes Hormon
MDH	: Malat-Dehydrogenase
NAD	: Nicotin-Adenin-Dinucleotid
NADP	: Nicotin-Adenin-Dinucleotid Phosphat
NADPH	: Reduziertes NAD
PMS	: Pregnant Mare's Serum (syn.: Serumgonadotropine)

Inhaltsverzeichnis

- A) Einleitung
- B) Material und Methodik
- C) Ergebnisse

I. Untersuchungen an nicht stimulierten alloxandibetischen Rattenovarien

Ovargewichte

Glukose

Lactat/Pyruvat

ATP/ADP

NADP/NADPH

Enzyme : G-6-PDH, ICD, MDH, Alkalische Phosphatase

Proteingehalt

Ultrastruktur

II. Untersuchungen an PMS/HCG - behandelten alloxandibetischen Rattenovarien.

Glukose

Lactat/Pyruvat

ATP/ADP

Enzyme

- D) Diskussion
- E) Literaturverzeichnis

Einleitung

Der Diabetes mellitus geht gewöhnlich mit einer Beeinträchtigung reproduktiver Funktionen einher. Der Zyklus erlischt, es kommt zu einem Dauer-diöstrus (DEB, CHATTERJEE 1963) und das Ovargewicht nimmt ab (FARINA, CHIERI, BASABE, FOGLIA 1971, LIU, LIN, JOHNSON 1972). Auch die Ansprechbarkeit der Ovarien auf exogen zugeführte Gonadotropine, die sonst einen ovariellen Gewichtsanstieg bewirken (STEELMAN, POHLEY 1953) ist eindeutig vermindert (PIVETTA, CHIERI, FOGLIA 1968). Am 3. Tag der Gravidität ist die Zahl der zur Implantation kommenden Eizellen reduziert und die gestörte Fertilität zeigt sich auch in Änderungen des uterinen Lipidstoffwechsels (FOGLIA, BORHELLI, CHIERI, FERNANDEZ - COLLAZO, SPINDLER, WESELEY 1963, CHIERI, PIVETTA, FOGLIA 1969, FOGLIA, CHIERI, PERALTA, RAMOS 1970, CHIERI, FRIDHANDLER 1965).

Untersuchungen zur Klärung der Frage, ob die Störung primär in den Gonaden liegt oder aber nur sekundär erfolgt durch eine verminderte Produktion und/oder Freisetzung von Gonadotropinen, haben ergeben, daß beim experimentellen Diabetes mellitus der Ratte weder beim Weibchen (LIU, LIN, JOHNSON 1972) noch beim Männchen (HOWLAND, ZEBROWSKI 1974) verminderte FSH und/oder LH-Spiegel im Plasma gefunden wurden. Diese Befunde ließen vermuten, daß die diabetischen Ovarien trotz suffizientem Gonadotropinlevel im Plasma, nicht mehr in der Lage sind, ausreichend auf den Stimulus zu reagieren. Studien zur Klärung dieser verminderten Ansprechbar-

keit auf gonadotrope Hormone haben ergeben, daß der Cholesteringehalt, der sonst unter LH im Ovar absinkt (HERBERT 1967), beim diabetischen Ovar weitgehend unverändert bleibt (FARINA, CHERI, BASABE, FOGLIA 1971). Um weitere Hinweise zu bekommen, wo der Ovarstoffwechsel durch den Diabetes mellitus gestört wird, haben wir durch vergleichende biochemische und elektronenmikroskopische Untersuchungen versucht, zur Klärung des Problems mitbeizutragen.

B) Material und Methodik

Die Untersuchungen wurden vorgenommen an weiblichen Sprague-Dowley-Ratten, die am Versuchsbeginn 19 Tage alt waren und zwischen 50 und 70 Gramm wogen. Während der Versuchsdauer wurden die Tiere mit Altromin und Wasser ad libidum ernährt.

Die juvenilen weiblichen Ratten erhielten am 20. Lebenstag 12 mg Alloxan/100g Körpergewicht subcutan injiziert. Alloxan wurde direkt zuvor in einem Phosphat-Citrat-Puffer bei pH 4,0 frisch angesetzt, entsprechend den Angaben von KLEBANOFF und GREENBAUM 1954.

Die Tötung der Tiere erfolgte nach 8 Tagen in Äthernarkose; es wurden nur Tiere verwandt, die bei täglichen Kontrollen eine Glukosurie aufwiesen. Zur Bestimmung des Blutzuckers wurde bei jedem Tier Blut durch Herzpunktion gewonnen und nach Enteiweißung mit 0,33N HClO_4 mit der Hexokinasereaktion (optischer Test Boehringer Mannheim) bestimmt.

Bei der zweiten Gruppe der Versuchstiere wurde eine Ovarialstimulation mit PMS und HCG vorgenommen : Am 23. Lebenstag wurde den Tieren 25,0 I.E. Anteron (mit vorwiegender PMS-FSH-Wirkung) in 0,9% NaCl-Lösung s.c. und 60 Stunden später 50 I.E. Primogonyl (mit vorwiegender HCG-LH-Wirkung) in 0,9% NaCl-Lösung s.c. injiziert. Die Ovarien zur Substratbestimmung kamen sofort in flüssigen Stickstoff und wurden dann mit 0,6 N- HClO_4 im Ultraturrax homogenisiert (4C°).

Danach 10 Minuten Zentrifugation bei 3000g. ATP, ADP, Lactat, Pyruvat wurden mit den optischen Tests der Firma Boehringer-Mannheim gemessen, Glukose mit der Hexokinasereaktion (Boehringer-Mannheim). NADP und NADPH wurden nach der von KLINGENBERG 1970 angegebenen Methodik bestimmt.

Die Extraktion der Ovarien zur Bestimmung der Enzyme erfolgte bei 4°C mit einem $K-Na_2HPO_4$ (100mM) - EDTA (2mM) Puffer bei pH 7,2. Nach dem Homogenisieren nochmalige Behandlung des Homogenisates mit Ultraschall (Ultraschall-homogenisator-Braun-Melsungen). Die Bestimmung der Enzyme erfolgte im 100000g Überstand mit den optischen Tests der Firma Boehringer-Mannheim. Der Proteingehalt wurde mit der Biuret-Methode ermittelt. Die Ovarien zur elektronenmikroskopischen Untersuchung wurden wie folgt präpariert : Fixierung bei 4°C in 2,5% Glutaraldehyd + 2% Formaldehyd in Kakodylatpuffer pH 7,4. (5 Stunden lang). Fixierung und Nachfixierung in 1% OsO_4 , entsprechend der Methoden nach KARNOVSKY 1965. Das Gewebe wird dann über Aceton entwässert und in Epon eingebettet. Silbergraue Ultradünnschnitte wurden mit Uranylacetat und Bleicitrat nach VENABLE und COGGESHALL 1965 nachkontrastiert, und mit dem EM 9s von Zeiss/Oberkochen untersucht. Untersucht wurden die luteinisierten, interstitiellen Drüsenzellen, da diese Zellen als Hormonproduktionsstellen in diesem Alter angesehen werden.

An dieser Stelle möchte ich Herrn Dr.med. H.O. Neumann von der Universität-Frauenklinik Marburg/Lahn recht herzlich

für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen, die in dieser Arbeit angeführt sind, danken. Seine Arbeit ermöglichte die Abrundung des vorliegenden Themas.

Ergebnisse

Wie bereits von anderen Autoren beschrieben, (17, 31) fanden sich deutliche Gewichtsunterschiede der Rattenovarien bei diabetischen und nicht-diabetischen Tieren. Das Durchschnittsgewicht des einzelnen Ovar der nicht-diabetischen Tiere lag bei 0,02g, das der alloxan-diabetischen Tiere bei 0,008g. Ein starker Gewichtsanstieg bei beiden Gruppen stellte sich nach der Stimulation mit PMS/HCG ein. Bei den Untersuchungen ließ sich mit großer Sicherheit ein Diabetes mellitus erzeugen, wenn Alloxan vor der s.c. Injektion in einem Phosphat-Citrat-Puffer bei pH : 4,0 frisch angesetzt wurde. Wie auf Abbildung 1 zu sehen, korrelierte der Blutzuckeranstieg genau mit einer Zunahme der intrazellulären Glukose- und Lactatkonzentration. Ein Blutzuckeranstieg um einen Faktor 2,8 bewirkte im Gewebe einen Glukose- und Lactatanstieg in der gleichen Größenordnung (Faktor 2,6). Das Verhalten von Pyruvat ist mit zunehmendem Schweregrad des Diabetes mellitus gegenläufig. Nach anfänglichem Anstieg der Pyruvatkonzentration bei Blutzuckerwerten um 180 mg/100 ml fällt Pyruvat im Ovar bis auf Werte um 0,100 μ Mol/g Ovar (Fg) ab, wenn die Blutzuckerwerte bis auf etwa 280 mg/100 ml ansteigen. Zunahme der Lactat und Abfall der Pyruvatkonzentration bewirken einen rapiden Anstieg des

intrazellulären Lactat/Pyruvatquotienten, was auch sicher zu einem lokalen pH-Abfall führt mit Verlust optimaler Bedingungen für enzymatische Reaktionen (siehe auch Abb. 3)

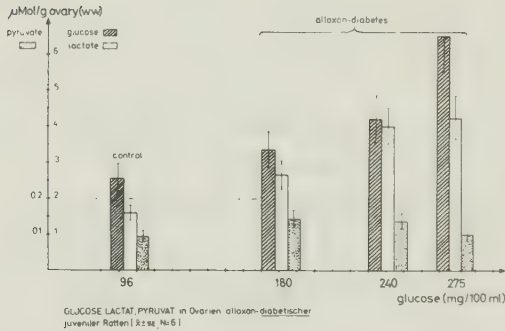


Abb.1:

Die Konzentrationen von Glukose, Lactat und Pyruvat in Ovarien, alloxan-diabetischer juveniler Ratten. $\bar{x}$, N = 6-8

Abbildung 2 demonstriert, wie sich die Gewebekonzentrationen der energiereichen Phosphate ATP und ADP unter dem Einfluß eines Diabetes mellitus ändern. Wie zu sehen, nimmt die ATP-Konzentration von 2,71 $\mu\text{Mol/g Ovar (Fg)}$ bei Normoglykämie rapide ab auf Werte um 0,7 $\mu\text{Mol ATP/g Ovar (Fg)}$ bei

einem Blutzuckerwert von 275 mg/100 ml ($p = 0,005$). ADP fällt zunächst bei 180 mg Glukose/100 ml ebenfalls von 0,92 auf 0,81 $\mu\text{Mol ADP/g Ovar}$ (Fg) ab und steigt dann wieder korrelierend mit dem ATP-Abfall an bis auf einen Gehalt von 0,94 $\mu\text{Mol g Ovar}$ (Fg).

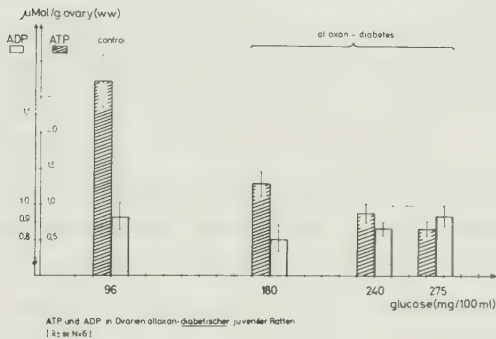


Abb.2:

Die Konzentrationen von ATP und ADP in Ovarien alloxan-diabetischer juveniler Ratten, $\bar{x} \pm \text{SE}$, $N = 6-8$

Auch der Gesamtgehalt der beiden energiereichen Phosphate ATP + ADP nimmt parallel dem Schweregrad des Diabetes mellitus um einen Faktor 2,2 ab:

ATP + ADP $\mu\text{Mol/g Ovar (Fg)}$	3,64	2,06	1,77	1,63
Glucose mg/100 ml	96	180	240	275

Tabelle 1

Intakte Zellen sind in der Lage, bestimmte Substratspiegel einzustellen, was eine intrazelluläre Stoffwechselkoordination und eine Regulation über die Zellmembran hinweg voraussetzt. Interessanterweise sind dabei, in gewissen Grenzen natürlich, nicht die absoluten Metabolitkonzentrationen maßgebend, sondern ihr Verhältnis zueinander. Die Stoffwechselregulation läuft also über die Einstellung bestimmter Metabolitquotienten. Das Unvermögen derartige Quotienten aufrechtzuerhalten, ist Ausdruck einer zellulären Schädigung.

Abbildung 3 demonstriert das Verhalten der beiden im Stoffwechsel so wichtigen Metabolitquotienten ATP/ADP und Lactat/Pyruvat. Beim ausgeprägten Diabetes mellitus findet sich ein Anstieg des L/P - Quotienten auf Werte über 40 (normal 10-20), bei einem gleichzeitigen Abfall des ATP/ADP-Quotienten auf Werte unter 1 (normal - 2-4). Diesen Zustand könnte man für den Stoffwechsel als eine "crux mortis" bezeichnen.

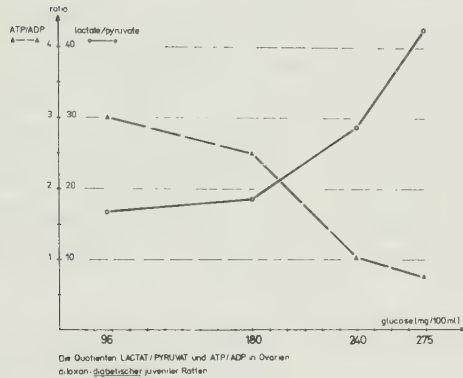


Abb.3: Die Quotienten ATP/ADP und Lactat/Pyruvat in Ovarien alloxan-diabetischer juveniler Ratten.

Die Überprüfung der Ovarien auf ihren Proteingehalt ergab, daß bei einem Diabetes mellitus mit Blutzuckerwerten um 200 mg/100 ml bereits ein deutlicher Abfall des Proteingehaltes im Vergleich zu den Normalkontrollen zu beobachten ist, wie aus Abbildung 5 zu ersehen.

NADPH ist ein wichtiges Coenzym für die ovarielle Stereoidbiogenese, es wird vor allem über die gonadotropin-induzierte Aktivierung des Pentosephosphatzyklus bereitgestellt. Das dafür verantwortliche Schlüsselenzym ist die Glucose-6-Phosphatdehydrogenase, sie erfährt unter LH eine starke Ak-

tivitätszunahme. (KIDWELL, BALOUGH 1966, McKERNS 1965, WIEST, KIDWELL 1969).

Um zu prüfen, ob der Ovarstoffwechsel beim Diabetes mellitus möglicherweise über eine verminderte Bereitstellung von reduziertem NADP gestört wird, wurden die beiden Coenzyme NADP und NADPH in Ovarien alloxandiabetischer Ratten gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4 dargestellt. Wie zu sehen, kommt es bei Blutzuckerwerten über 300 mg/100 ml zu einer Abnahme der NADPH-Konzentration im Ovar ($p < 0,025$).

Interessanterweise kam es bei Blutzuckerwerten um 160 mg/100 ml zunächst zu einer Zunahme der NADPH-Konzentration im Ovar, was möglicherweise über den erhöhten Glukoseanstau zu erklären ist, der zu einem Substratdruck auf Glykolyse und Pentosephosphatzyklus führt.

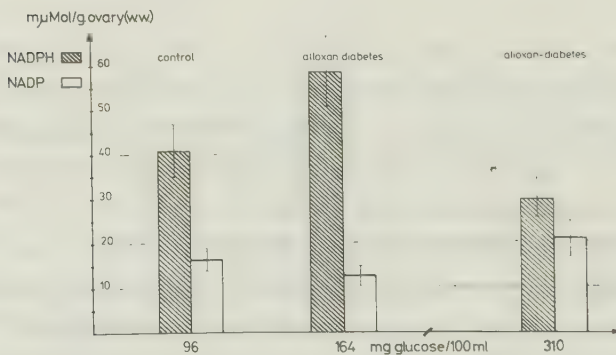


Abb.4:

Abb.4: NADP und NADPH in Ovarien alloxan-diabetischer juveniler Ratten.

$\bar{x} \pm SE$, N = 6

Tabelle 2 Zeigt die Aktivitäten der beiden NADP - abhängigen Enzyme G-6-P-Dehydrogenase und Isocitrat-Dehydrogenase, der NAD-abhängigen Malat-Dehydrogenase, sowie der alkalischen Phosphatase.

Enzyme	Aktivität in U/g Ovar (Fg)			p-Test I - III
	I	II	III	
G-6-PDH	5,37 $\pm$ 0,82	5,09 $\pm$ 0,86	3,47 $\pm$ 0,64	p < 0,05
ICD	19,7 $\pm$ 3,10	18,3 $\pm$ 2,9	12,3 $\pm$ 2,10	p < 0,02
MDH	247 $\pm$ 40,0	199 $\pm$ 38,0	130 $\pm$ 25,0	p < 0,01
Alkalische Phosphatase	12,4 $\pm$ 1,80	14,6 $\pm$ 2,04	16,9 $\pm$ 2,00	p < 0,025
Blutzucker				
mg glucose/ 96 100 ml		172	290	

Tabelle 2 Die Aktivitäten der G-6-PDH, Isocitrat-DH, Malat-DH, sowie der alkalischen Phosphatase in juvenilen, alloxan-diabetischer Ratten.

$\bar{x} \pm SE$, N = 6-8

Der alloxan-induzierte Diabetes mellitus führt also auch zu einem deutlichen Aktivitätsverlust aller drei gemessenen wasserstoffübertragenden Enzyme, was eine Erklärung für den NADPH-Abfall darstellt. Die Aktivität der alkalischen Phosphatase nahm Überraschenderweise um etwa 37% zu.

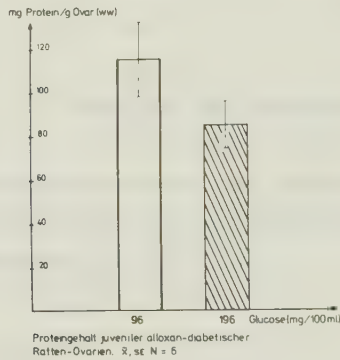


Abb.5: Proteingehalt in Ovarien alloxan-diabetischer juveniler Ratten. $\bar{x}$, $\pm$ SE, N = 6

Die bisher besprochenen Ergebnisse laufen den Änderungen in der zellulären Ultrastruktur parallel. Abbildung 6 zeigt eine luteinisierte interstitielle Zelle von Ovarien alloxan-diabetischer juveniler Ratten.

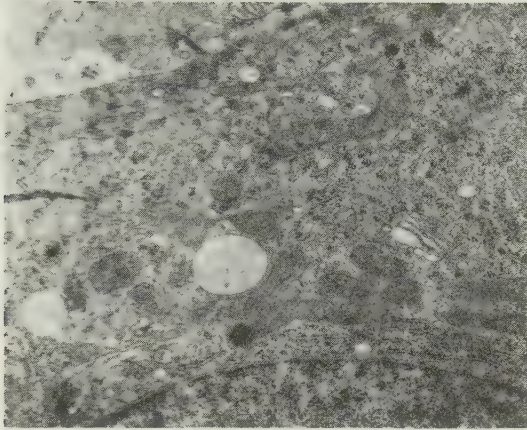


Abb.6: Ultrastruktur einer luteinisierten interstitiellen Zelle einer alloxan-diabetischen juvenilen Ratte.

Als erfaßbares morphologisches Substrat ist das rauhe endoplasmatische Reticulum fast ganz verschwunden, die Ribosomen haben sich abgelöst und sind nur noch gruppiert und frei im Zytoplasma zu finden. In diesen Strukturen läuft aber ein wesentlicher Teil des zellulären Eiweißstoffwechsels ab. Das glatte endoplasmatische Reticulum ist in seiner für steroidproduzierende Zellen typischen Weise voll entfaltet und zeigt morphologisch keine Veränderungen. Der Golgi-Komplex ist um den Zellkern weniger stark entwickelt. Die Cholesterinesterspeicher sind durch den Vorgang der

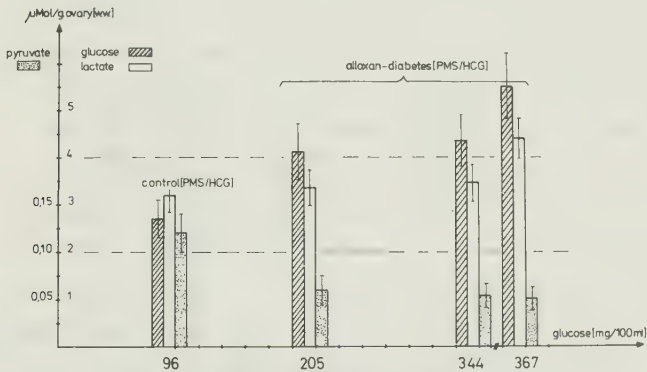
elektronenmikroskopischen Präparation entleert, sie erscheinen als Vakuolen. Die Mitochondrien sind im diabetischen Ovar etwas seltener vorhanden, kleiner und runder als Zeichen eines Schrumpfungsprozesses. Die Matrix ist dicht und nur mit auffällig wenig cristae ausgestattet. Dieses morphologische Bild entspricht in seiner Tendenz den sogenannten Hypoxiemitochondrien.

II Untersuchungen an PMS/HCG behandelten alloxandiabetischen Rattenovarien.

Die Glukosekonzentration in den stimulierten Rattenovarien zeigt keine wesentlichen Unterschiede zu den Verhältnissen bei den nicht stimulierten Rattenovarien, wie dem Vergleich der Abb. 7 + 1 aus Abb. 1 zu ersehen ist. Auch bei den stimulierten Rattenovarien ist das Phänomen zu beobachten, daß mit dem Schweregrad des Diabetes mellitus die Glukosekonzentration im Gewebe ansteigt.

Durch die Stimulation kommt es aber im Vergleich zu den nicht stimulierten Kontrollen zu einem deutlichen Anstieg der Lactatkonzentration in den Rattenovarien. Dieses Phänomen wurde bereits schon von anderen Autoren beobachtet, es konnte nämlich an praepubertalen Rattenovarien gezeigt werden, daß nach einer in vitro LH-Gabe die Lactatproduktion an vier Stunden später inkubierten Gewebeschnitten deutlich anstieg (6).

Hierbei zeigte sich in weiteren Untersuchungen, daß zwischen der LH-Dosis und der Lactatproduktion der Ovarien sogar eine Abhängigkeit besteht (3,21,39), und an Ovarien hypophysectomierter Ratten ließ sich in der Tat eine exakte Dosis-wirkungsrelation zwischen LH-Gabe und Lactatproduktion aufzeigen (21)



GLUCOSE, LACTAT und PYRUVAT im Ovar alloxan-diabetischer Ratten nach der Stimulation mit PMS/HCG. ($\bar{x} \pm \text{SE}$, N=6)

Abb.7: Glukose, Lactat und Pyruvat im Ovar alloxan-diabetischer Ratten nach Stimulation mit PMS/HCG $\bar{x} \pm \text{SE}$, N = 6

Wie aus Abb.7 hervorgeht, führt auch bei den stimulierten Ratten der alloxaninduzierte Diabetes mellitus zu einem wei-

teren Anstieg der Lactatkonzentration in den Ovarien, der ähnlich den Verhältnissen der Glukosekonzentration dem Schweregrad des Diabetes parallel läuft. Ein geringer Unterschied im Vergleich zu den nicht stimulierten Ratten besteht darin, daß der Lactatanstieg nicht so akut erfolgt, sondern erst bei einem höheren Schweregrad des Diabetes mellitus. Bei den nicht stimulierten Tieren wird ein intraovarieller Lactatgehalt von ca. $4,2 \mu\text{M/g}$ Ovarfrischgewicht bei 275 mg% Glukose im Blut erreicht, bei den stimulierten Ratten dagegen ein gleichhoher Lactatgehalt im Gewebe erst bei einem Glukosegehalt von ca. 367 mg%. Der Pyruvatgehalt steigt unter der Behandlung mit PMS/HCG an, wie ein Vergleich der Abb.1 und 7 deutlich zeigt. Dieser Stimulationseffekt konnte auch von anderen Autoren aufgezeigt werden. Der beobachtete Effekt der Stimulierung des Kohlehydratstoffwechsels durch LH hat wohl verschiedene Ansatzpunkte, denn einerseits erwiesen sich Membranpermeabilität und Membrantransport für Glukose, Galktose und andere Monosaccharide stimulierbar (5,7), andererseits zeigten sich spezifische Enzyme des Kohlehydratstoffwechsels in ihrer Aktivität durch LH beeinflussbar, so daß die Glykogenphosphorylase (4,7,32,41,43) die Succinatdehydrogenase (2), und die Glukose-6-phosphat-dehydrogenase (26,35,36,34,46). Kommt bei den stimulierten Tieren ein Alloxandibetes dazu, so erfolgt ein rapider Abfall der Pyruvatkonzentration im Ovargewebe, der bereits bei ca. 205 mg% Glukose` significant

eintritt. Danach ist bei einem weiteren Anstieg des Blutzuckergehaltes der Pyruvatabfall allerdings nicht mehr so ausgeprägt.

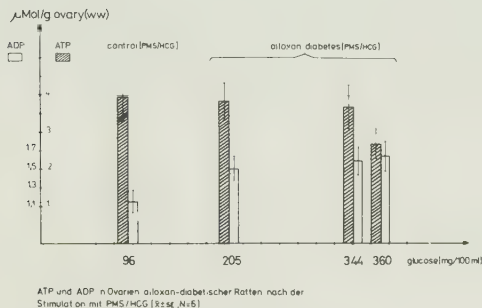


Abb.8: ATP und ADP in Ovarien alloxan-diabetischer Ratten nach der Stimulation mit PMS/HCG
 $\bar{x} \pm SE$, N = 6

Wie aus Abb.8 zu ersehen, bewirkt die Stimulation mit PMS/HCG bei den Kontrollen einen hochsignifiquanten Anstieg des ATP-Gehaltes in den Ovarien um ca. 50%, das entspricht ca. 4 μmol ATP pro Gramm Ovarfrischgewicht. Interessanterweise kommt es unter dem Einfluß des Alloxandiabetes nur zu einem sehr verzögert einsetzenden Abfall des ATP-Gehaltes, der erst bei ca. 360 mg% Blutzucker einen deutlichen Abfall auf-

weist. Es zeigt sich somit, daß die stimulierten Rattenovarien vor den destruktivmetabolischen Einflüssen eines alloxaninduzierten Diabetes mellitus weitgehend geschützt sind. Dazu interessant sind die Untersuchungen von HAMBERGER und AHREN 1967 (22), die zeigen konnten, daß der Sauerstoffverbrauch isolierter Granulosazellen unter LH deutlich ansteigt, was beweist, daß die oxydative Phosphorylierung unter LH aktiviert wird, was letztlich zu einer de novo synthese von ATP führt.

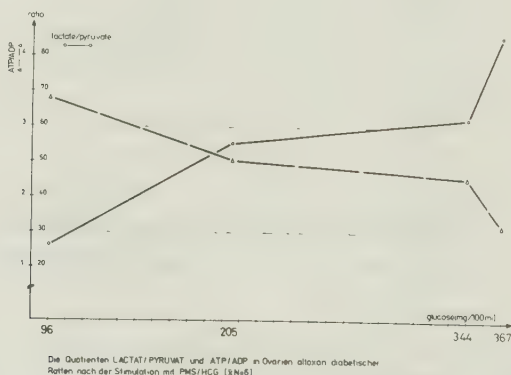


Abb.9: Die Quotienten Lactat/Pyruvat und ATP/ADP in Ovarien alloxan-diabetischer Ratten nach Stimulation mit PMS/HCG

Wie aus den Kontrollen zu ersehen ist, bewirkt die Stimulation allerdings auch einen Anstieg im ADP-Gehalt der Ova-

rien, der bei den hier durchgeführten Untersuchungen etwa bei 20% liegt. Dieser Effekt entspricht den bisher gefundenen Kenntnissen. Es ist bekannt, daß der ATP-Umsatz unter LH wesentlich ansteigt (1,5). Auch die stimulierten Rattenovarien zeigen unter dem Einfluß eines alloxaninduzierten Diabetes mellitus einen deutlichen ADP-Anstieg, der allerdings bei zunehmender Schwere des Diabetes mellitus nicht so steil verläuft wie bei den nicht stimulierten Ovarien.

Wie bekannt ist, läuft die Regulation des Stoffwechsels über die Einstellung bestimmter Metabolitquotienten. Somit sind in gewissen Grenzen natürlich, nicht die absoluten Konzentrationen der Substrate maßgebend, sondern ihre Relation untereinander. Abb.9 zeigt noch einmal die im Stoffwechsel so wichtigen Redoxquotienten Lactat/Pyruvat und ATP/ADP. Wie schon bei den nicht stimulierten Rattenovarien (Abb.3) kommt es unter dem Einfluß eines Alloxandiabetes zu einem deutlichen Anstieg des Lactat-Pyruvat-Quotienten auf Werte über 50 und zu einem ebenfalls ausgeprägten Abfall des ATP/ADP-Quotienten auf Werte um 1,5. Bei der Interpretation dieses Befundes ist es jedoch wesentlich herauszustellen, daß die Veränderung dieser eben beschriebener Quotienten unter der Stimulation mit PMS/HCG wesentlich langsamer erfolgt, also erst bei einem wesentlich höheren Blutzuckergehalt und damit einem höheren Schweregrad des Diabetes mellitus. Die bei dieser Untersuchung gefundenen ATP/ADP-Quotienten liegen bei den Kontrollen in dem in der Literatur angegebenen physiologischen Bereich.

Diskussion

Die Ergebnisse demonstrieren, daß der Ovarstoffwechsel beim alloxan-induzierten Diabetes mellitus primär schwer gestört wird. Die morphologisch erfaßbaren Veränderungen an den Mitochondrien, wie man sie auch in hypoxischen Geweben wiederfindet, sprechen im Zusammenhang mit dem signifikanten Abfall der ATP-Konzentration und dem Abfall des ATP/ADP-Quotienten für eine Hemmung der Atmungskettenphosphorylierung. Darin dürfte vielleicht eine wichtige Ursache zu suchen sein, warum die Gonadotropine trotz normalem level im Plasma ihre Wirkung nicht entfalten können. Denn ein wesentlicher Effekt von LH zum Beispiel besteht ja bekanntlich darin, daß über die Stimulierung der Adenyl-cyclase aus ATP zyklisches AMP gebildet wird, das dann als second messenger fungiert (SUTHERLAND, RALL, MENON 1962, DORRINGTON, KILPATRICK 1967). Ein ausreichendes ATP-Angebot im Ovar ist also sicher eine Voraussetzung für die Wirkung von LH. Für die Störung der Proteinsynthese spricht, daß das rauhe endoplasmatische Reticulum fast vollständig verschwindet und der Proteingehalt im Ovar auch gleichzeitig abnimmt. Diese Befunde stehen im Einklang mit den Untersuchungen von MARTIN und BALDWIN 1971, die auch in der Mamma diabetischer Ratten eine Verminderung der Gesamtproteinsynthese um 70% nachweisen konnten; Insulingabe normalisierte die Proteinsynthese. Dieselben Autoren fanden auch, daß sich die Hexokinase von den Membranen ablöst und dann frei im Zytoplasma liegt.

Auch die Ribosomen zeigten ja ein Ablösen vom rauhen endoplasmatischen Reticulum (Abb.6) und sind frei im Zytoplasma zu finden. Möglicherweise kommt es beim Diabetes mellitus im Ovar auch zu einer noch unbekannten Störung der Synthese von Membranstrukturen, wofür auch die bisher schon in Leber, Fettgewebe und Mamma nachgewiesene Hemmung der Fettsäuresynthese sprechen würde. (FAIN, SCOW, URGOTI, CHERNICK 1965, MARTIN, BALDWIN 1971). Der Aktivitätsverlust wasserstoffübertragender Enzyme geht dem Abfall der NADPH-Konzentration im Ovar parallel und dürfte somit die Ursache für das verminderte Angebot dieses für die Steroidbiogenese so wichtigen Coenzym sein. Interessanterweise kam es zu einem Anstieg der alkalischen Phosphatase. Dieser Befund hat seine Erklärung sicher darin, daß die Nebennierenrinde diabetischer Ratten zunimmt und ihre Steroidproduktion um gut 30% ansteigt (DEVECERSKI, FRAWLEY 1963), denn die alkalische Phosphatase reagiert fast spezifisch auf den Einfluß von Glukocorticoiden mit einer Aktivitätszunahme (CHIEFFI, CARFAGNA 1960, MOOG 1952, McLEOD 1961), während die Adrenalektomie sofort zu einer Aktivitätsminderung der alkalischen Phosphatase im Ovar führt (STÄHLER, NEUMANN 1974).

Ob die Stoffwechselstörungen auch ursächlich mit einem Defekt im Gefäßsystem einhergehen, mußte zusätzlich einmal untersucht werden, denn SCHEER und LAWRENCE 1971 fanden nach Alloxan eine vermehrte Durchlässigkeit der Kapillaren bevor morphologische Veränderungen sichtbar waren.

Diabetische Ovarien sind jedenfalls in ihrer Stoffwechselregulation durch den Anstieg des Lactat/Pyruvatquotienten bei gleichzeitigem Abfall des ATP/ADP-Quotienten stark beeinträchtigt.

Die Stimulation der Rattenovarien mit PMS/HCG führte im wesentlichen zu folgenden Veränderungen : Anstieg des Lactatgehaltes, sowie ein Anstieg des ATP-Gehaltes im Vergleich zu den nicht stimulierten Kontrollen. Diese Ergebnisse entsprechen bekannten Untersuchungen aus der Literatur, die dafür sprechen, daß die Stimulation mit hypophyserem Gonadotropin im Ovargewebe einmal die Glykolyse stimuliert bzw. aktiviert, und zum anderen zu einer deutlichen Aktivierung der oxidativen Phosphorelierung führt. Dieser beobachtete Effekt der Stimulierung des Kohlehydratstoffwechsels durch LH hat, nach Daten aus der Literatur zu beurteilen, verschiedene Ansatzpunkte : Einmal erwiesen sich Membranpermeabilität und Membrantransport für Glukose, Galaktose und andere Monosaccharide stimulierbar (5,7), andererseits werden spezifische Enzyme des Kohlehydratstoffwechsels in ihrer Aktivität durch LH beeinflußt, so die Glykogen-phosphorylase (4,7,32,41,43) weiterhin die Succinaddehydroginase (2) und die Glucose-6-phosphat-dehydrogenase (26,34,35,36,46). Der beobachtete Lactatanstieg scheint sogar im Rattenovar ein LH-Spezifikum zu sein. Untersuchungen über dieses Phänomen zeigten, daß LH-Dosis und Lactat-

Produktion in einem linearen Verhältnis zueinander stehen. (21). Aus diesem Grunde kommt es auch unter der Stimulation mit PMS/HCG zu Änderungen in dem Verhalten der Redoxquotienten ATP/ADP und Lactat/Pyruvat, die in beiden Fällen deutlich über den gefundenen Werten der Kontrollen liegen.

Die Ergebnisse machen deutlich, daß ein alloxan-induzierter Diabetes mellitus auch bei voll durchstimulierten Rattenovarien zu fast den selben Veränderungen führt, wie bei den nicht stimulierten Kontrollen, wobei es aber wichtig ist herauszustellen, daß die Stoffwechseländerung erst mit einer gewissen Verzögerung eintritt, d.h., alle beobachteten Änderungen in den Stoffwechselfparametern treten erst bei einem höheren Schweregrad des Diabetes mellitus auf. Somit kommt dem hypophysionellen Gonadotropin bei einer diabetischen Stoffwechsellage eine gewisse Schutzfunktion zu. Dieses Phänomen dürfte seine Ursache darin haben, daß eine der wesentlichen Wirkungen der hypophyseren Gonadrotropine in einer Aktivitätssteigerung der oxidativen Phosphorylierung zu suchen ist, während der Diabetes mellitus gerade entgegengesetzte Wirkungen entfaltet.

Literaturverzeichnis
=====

- 1) Ahren, K., Beviz, A., Hamberger, L., Lundholm, L.: Mechanism for the action of LH on the carbohydrate metabolism of the prepubertal rat ovary. *Acta physiol.scand.* 73, 23A - 24A (1968).
- 2) Ahren, K., Hamberger, A.C., Hamberger, L.A.: Action of luteinizing hormone in vitro on respiratory enzyme activity of isolated granulosa cells. *Endocrinology* 77, 332 - 336 (1965).
- 3) Ahren, K., Hamberger, L., Perklev, T.: Effects of human menopausal gonadotrophin and ovine follicle stimulatory hormone on lactic acid production by ovaries from prepubertal rats. *Endocrinology* 82, 420 - 422 (1968).
- 4) Ahren, K., Selstam, G.: Hormonal regulation of ovarian phosphorylase activity (rat:incl. LH, FSH). *Acta physiol. scand.* 82, 31A - 32A (1971).
- 5) Ahren, K., Hamberger, L., Rubinstein, L.: Acute in vivo and in vitro effects of gonadotrophins on the metabolism of the rat ovary. In: *The Gonads* (K.W. McKerns, ed.), p. 327 - 354. North-Holland-Publishing-Company, Appleton-Century-Crofts 1969.
- 6) Armstrong, D.T., Greep, R.O.: Effect of gonadotrophic hormones on glucose metabolism by luteinized rat ovaries. *Endocrinology* 70, 701 - 710 (1962).
- 7) Channing, C.P., Ville, C.A.: Effects on uptake and metabolism of hexoses by luteinized rat ovaries. *Biochem. biophys. Acta (Amst.)* 115, 205 - 218 (1966).

- 8) Chieri, R.A., Pivetta, O.H., Foglia, V.G.: Altered ovulation pattern in experimental diabetes. *Fertil.Steril.* 20, 661 (1969).
- 9) Chieri, R.A., Fridhandler, L.: Effect of diabetes and insulin treatment on in vitro uptake of acetate $1-C^{14}$ into rat uterine lipids. *Fertil.Steril.* 16, 826 (1965).
- 10) Chieffi, G., Carfagna, M.: The alkaline phosphatase of the intestinal epithelium of *Bufo vulgaris* tadpoles during metamorphosis. The influence of hydrocortisone on the epithelial phosphatase in vitro. *Acta Embryol. morphol. Exptl.* 3, 213 (1960).
- 11) Cox, R.P., McLeod, C.M.: Hormonal induction of alkaline phosphatase in human cells in tissue culture. *Nature* 190, 85 (1961).
- 12) Davis, M.E., Fugo, N.W., Lawrence, K.G.: Effect of alloxan-diabetes on reproduction in the rat. *Proc.Soc.Exp. Biol.Med.* 66, 638 (1947).
- 13) Deb, Ch., Chatterjee, A.: Role of ascorbic acid in the inhibition of estrous cycle in alloxan diabetes (rat). *Endocrinology* 72, 159-160 (1963).
- 14) Devecerski, M.S., Frawley, Th. F.: Adrenal steroid production in rats with alloxan diabetes. *Endocrinology* 71, 386 - 391 (1963)
- 15) Dorrington, J.H., Kilpatrick, R.: Effect of adenosine 3-5 monophosphate on the synthesis of progestational steroids by rabbit ovarian tissue in vitro. *Biochem J.* 104, 725 - 731 (1967).

- 16) Fain, J.N., Scow, R.O., Urgoiti, E.J., Chernick, S.S.:
Effect of Insulin on fatty acid synthesis in vivo and
in vitro in pancreatectomized rats. *Endocrinology* 77,
137 -149 (1965).
- 17) Farina, J.M. S., Chieri, R.A. Basabe, J.C., Foglia, V.G.:
Response to gonadotrophins in mature and immature dia-
betic female rats. *Fertil.Steril.* 22, 794 (1971).
- 18) Foglia, V.G., Borghelle, R.F., Chieri, R.A., Fernandez-
Collazo, E.I., Spindler, I., Weseley O.: Sexual distur-
bances in the diabetic rat. *Diabetes* 12, 231 (1963).
- 19) Foglia, V.G., Chieri, R.A., Peralta-Ramos, M.C.: Mecha-
nismus of disturbances during pregnancy in the diabetic
female rats. *Horm.metab.Res.* 2, 76 (1970).
- 20) Fowler, D.D., Szego, C.M., Sloan, S.H.: Curtailment of
the uterotrophic action of estrogen by impaired hista-
mine libration in the alloxan diabetic rat: Reversal by
insuline and adrenalectomy. *Endocrinology* 72, 626 (1963)
- 21) Hamberger, L., Ahren, K.: Effects of gonadotrophins in
vitro on glucose uptake and lactic acid production of
ovaries from prepubertal and hypophysectomized rats.
Endocrinology 81, 93-100 (1967).
- 22) Hamberger, L., Ahren, K.: Action of gonadotrophins on
respiratory enzyme activity of isolated ovarian cells
from the rat. *Acta endocr. (Kbh.)* 56, Suppl. 119, 113
(1967).
- 23) Herbert, A.L.: Response of rat ovarian cholesterol to
gonadotrophins and anterior pituitary hormone. *Endocri-
nology* 81, 54 (1967).

- 24) Howland, B.E., Zebrowski, E.J.: Serum and pituitary gonadotropin levels in alloxan-diabetic rats. *Horm.metab. Res.* 6, 121 (1974).
- 25) Karnowsky, M.J.: A formaldehyde - glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J. Cell.Biol.* 27, 137 A (1965).
- 26) Kidwell, W., Balough, K., Jr., W.g.: Effects of luteinizing hormones on glucose-6-phosphat- and 20a Hydroxysteroid-dehydrogenase activities in superovulated rat ovaries. *Endocrinology* 79, 352-361 (1966).
- 27) Klebanoff, S.J., Greenbaum, A.L.: The effect of pH on the diabetogenic action of alloxan. *J.Endocrin.* 11, 314-322 (1954)
- 28) Klingenberg, M.: Nicotinamid-adenin-dinucleotide. Spektrophotometrische und fluorimetrische Verfahren. In: *Methoden der enzymatischen Analyse II* (Hrsg. H.K. Bergmeyer), S. 1981 und 1991. Weinheim-Bergstraße: Verlag Chemie (1970).
- 29) Lawrence, A.M., Contopoulos, A.N.: Reproduction performance in the alloxan diabetic female rat. *Acta endocr.* 33, 175 (1960).
- 30) Lindan, O., Morgan, M.E.: Alloxan diabetes and pregnancy: a long term observation. *J. Endocr.* 6, 463 (1950).
- 31) Liu, F.T.Y., Lin, H.S., Johnson, D.C.: Serum FSH, LH and the ovarian response to exogenous gonadotropins in alloxan diabetic immature female rats. *Endocrinology* 91, 1172 (1972).

- 32) Marsch, J., Savard, K.: The activation of luteal phosphorylase by LH. *J.biol. Chem.* 239, 1-7 (1964).
- 33) Martin, R.J., Baldwin, R.L.: Effects of alloxan diabetes on lactational performance and mammary tissue metabolism in the rat. *Endocrinology* 88, 863-867 (1971).
- 34) McKerns, K.W.: Gonadotropin regulation of the activities of dehydrogenase enzymes of the ovary. *Biochem. Biophys. Acta (Amst.)* 97, 542-550 (1965).
- 35) McKerns, K.W., Criss, M., Criss, W.E.: Gonadotropin regulation of dehydrogenase enzymes in the ovary of *Squalus acanthias*. *Bull. Mount Desert Island Biological Laboratory, Salisbury Cove, Maine* 7, 29-32 (1968).
- 36) McKerns, K.W.: Studies on the regulation of ovarian function by gonadotrophins. In: *The Gonads* (K.W.McKerns, ed.), p.137-173. North-Holland-Publishing-Company. Appleton-Century-Crofts 1969.
- 37) Moog, F.: The differentiation of enzymes in relation to the functional activities of the developing embryo. *Ann. N.Y. Acad.Sci.* 55, 57 (1952).
- 38) Neumann, H.O. Stähler, E.: Elektronenmikroskopische und enzymatische Untersuchungen am stimulierten Ovar der alloxan-diabetischen Ratte. Vortrag gehalten auf der Tagung der Oberrheinischen Gesellschaft für Geburtshilfe und Gynäkologie in Freiburg/Brsg. am 25.-27.10.1973
- 39) Perklev, T., Berglund, H.B., Ahren, K.: Effect of HCG, LH and Anti-HCG-serum on the lactic acid production of the prepubertal rat ovary. *Acta endocr. (Kbh.)* 68, 31-40 (1971).

- 40) Scheer, St.M., Lawrence, A.M.: Functional microangiopathy in alloxan diabetic rats. *Acta endocr. (Kbh.)* 66, 357-367 (1971).
- 41) Selstam, G., Ahren, K.: Effects of gonadotrophins on ovarian phosphorylase activity (rat). *Acta endocr. (Kbh.)* 67, Suppl. 155, 55 (1971).
- 42) Stähler, E., Neumann, H.O.: Tier experimentelle Untersuchungen über den Einfluß der Nebenniere auf Funktion und Ultrastruktur des Gelbkörpers. 40.Tagung der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe Wiesbaden 24.-28.9.1974
- 43) Stansfield, D.A., Robinson, J.W.: Glycogen and phosphorylase in bovine and rat corpora lutea and the effect of LH. *Endocrinology* 76, 390-395 (1965).
- 44) Steelman, S.L., Pohley, F.M.: Assay of the follicle stimulating hormone based on the augmentation with human chorionic gonadotrophin. *Endocrinology* 53, 604 (1953).
- 45) Sutherland, E.W., Rall, T.W., Menon, T.: Adenyl-cyclase. I Distribution, preparation and properties. *J.Biol.Chem.* 237, 1220-1227 (1962).
- 46) Wiest, W.G., Kidwell, W.R.: The regulation of progesteron secretion by ovarian dehydrogenase. In: *The Gonads* (ed. K.W. McKerns). New York: North-Holland-Publishing-Company, Appleton Century Crofts 1969

Für die Vergabe des Themas und seine hilfreiche Unterstützung bei dieser Arbeit danke ich recht herzlich
Herrn Privat-Dozent Dr.Med. E. Stähler.

Lebenslauf

Am 25. Juni 1947 wurde ich in Berlin als zweiter Sohn des Kaufmannes Kurt Niethammer und seiner Ehefrau Marianne geboren. 1948 übersiedelte die Familie nach Stuttgart, wo ich von 1954 bis 1958 die Volksschule besuchte. Nach erneutem Umzug folgte die weitere Ausbildung am Gymnasium Gernsheim am Rhein in Hessen, mit abschließender Reifeprüfung im Jahre 1966. Es folgte die Einberufung zur Ableistung des 15-monatigen Grundwehrdienstes. Zum SS 1968 konnte ich mein Medizinstudium an der Philipps-Universität in Marburg/Lahn aufnehmen, wo ich auch im August 1974 mein Staatsexamen erfolgreich ablegte. Während den klinischen Semestern führte ich im Labor der Universitätsfrauenklinik Marburg unter Anleitung von Herrn Priv.-Doz. Dr. med. E. Stähler die für meine Dissertation erforderlichen experimentellen Arbeiten durch. Im August 1974 gebar meine von mir am 15.9.1972 geheiratete Frau unsere Tochter Beatrix.

Ab September 1974 leistete ich am Krankenhaus St. Trudpert in Pforzheim meine chirurgische Medizinalassistentenzeit ab, später wechselte ich auf die innere Abteilung des selben Hauses, an der ich auch nach meiner Approbation im Oktober 1975 als Assistenzarzt weiterarbeitete.

